



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

Veröffentlichungsnummer:

**0 322 712  
A2**

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

Anmeldenummer: 88121299.7

Anmeldetag: 20.12.88

Int. Cl.4: **A61K 39/015 , C12N 15/00 ,  
C12P 21/02 , A61K 39/395 ,  
C12Q 1/68 , G01N 33/569**

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten:  
ES + GR.

Priorität: 30.12.87 DE 3744495  
15.09.88 DE 3831351

Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
05.07.89 Patentblatt 89/27

Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

Anmelder: **BEHRINGWERKE**  
Aktiengesellschaft  
Postfach 1140  
D-3550 Marburg 1(DE)

Erfinder: **Knapp, Bernhard, Dr.**  
Baumgarten 9  
D-3550 Marburg-Schröck(DE)  
Erfinder: **Hundt, Erika, Dr.**  
Zum Hirtzborn 8  
D-3550 Marburg-Wehrshausen(DE)  
Erfinder: **Enders, Burkhard, Dr.**  
Oberer Eichweg 12  
D-3550 Marburg(DE)  
Erfinder: **Küpper, Hans, Dr.**  
Biegenstrasse 39  
D-3550 Marburg(DE)

Vertreter: **Meyer-Dulheuer, Karl-Hermann, Dr.**  
et al  
**HOECHST** Aktiengesellschaft Zentrale  
Patentabteilung Postfach 80 03 20  
D-6230 Frankfurt/Main 80(DE)

**Malaria-spezifische DNA-Sequenzen, ihre Expressionsprodukte und deren Verwendung.**

Die Erfindung betrifft malaria-spezifische DNA-Sequenzen, ihre Expressionsprodukte und deren Verwendung. Eine Kombination von drei der Expressionsproteine, deren DNA-Sequenzen durch Screening einer lambda gt11-Genbank mit einem monospezifischen Antiserum gegen die protektive 41 kD-Antigenbande aus P.falciparum isoliert wurden, schützen in Modellversuchen Aotusaffen vollständig vor einer P.falciparum-Infektion.

EP 0 322 712 A2

## Malaria-spezifische DNA-Sequenzen, ihre Expressionsprodukte und deren Verwendung

Ein wichtiger Schritt zur Entwicklung einer Vaccine gegen Malaria ist die Identifizierung protektiver Antigene. Als protektiv werden im allgemeinen solche Antigene eingestuft, die bei in vivo Versuchen im Tiermodell wie z.B. in Saimiri- oder Aotus-Affen einem Schutz vor einer intravenös gesetzten *P.falciparum*-Infektion ergeben haben. Bisher sind nur unbefriedigende Schutzversuche am Menschen beschrieben worden, aber mehrere isolierte *P.falciparum* Proteine haben eine komplette oder teilweise Schutzwirkung im Tiermodell gezeigt. Dies trifft sowohl für gelektrophoretisch gereinigte Proteinfractionen von 75kD und 100kD zu als auch für die gelektrophoretisch gereinigten Proteinbanden der Molekulargewichte 200kD, 140kD und 41kD (L.H. Perrin et al. (1984), Clin.exp.Immunol. 56, 67-72; L.H. Perrin et al. (1985) J.Clin.Invest. 75, 1718-1721; W.A. Siddiqui et al. (1987), Proc.Natl. Acad.Sci., USA 84, 3014-3018). Von den bisher biotechnologisch hergestellten für Merozoiten spezifischen Proteinen zeigten ein rekombinantes Expressionsprotein der "5' repeat Region" des sog. RESA 155kD Merozoitenproteins als auch ein synthetisches Oligopeptid des 200kD Merozoitenoberflächen-Vorläuferproteins sowie eine Kombination synthetischer Oligopeptide von Proteinen der Molekulargewichte 35kD, 55kD und 200kD in Immunisierungsversuchen mit Saimiri- oder Aotusaffen eine partielle Schutzwirkung. Gentechnologisch hergestellte rekombinante Proteine der obigen Antigene, welche eine Schutzwirkung in in vivo Experimenten mit Affen zeigen, sind potentielle Kandidaten für eine Malaria-Vaccine.

Ziel der Arbeiten war es, codierende Sequenzen für die von L. Perrin (1985 a.a.O) beschriebene protektive 41kD-Antigenbande zu isolieren, die Sequenzen zur Expression zu bringen und die Expressionsprodukte auf ihre protektive Wirkung hin im Affenmodell zu testen. Mit Hilfe eines spezifischen Antiserums gegen die 41 KD-Antigenbande wurden aus einer genomischen Expressionsbank fünfzehn Klone isoliert und die Struktur ihrer Insertionen aufgeklärt. Die Sequenzen der Klone 41-1 bis 41-10 und 41-12 bis 41-15, sowie 41-17 sind in Tab. 1-15 dargestellt. Mit Hilfe zweier immunologisch sehr intensiv reagierender Klone (41-2 und 41-7) wurden aus dem zum Screening verwendeten Serum monospezifische Antikörper isoliert. Diese Antikörper reagieren im Western Blot spezifisch mit einem Merozoiten-Antigen von 41 kD.

Mit der Insert DNA des Klons 41-2 hybridisierte im Southern Blot ein 3,0 kb EcoRI-Fragment und ein 2,0 kb Sau3A-Fragment. Beide DNA-Fragmente wurden isoliert und sequenziert.

Das Sau3A-Fragment enthält die vollständige codierende Region des 41-2 Gens. Diese enthält keine Introns und codiert für 184 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 21512 D. Das 41-2 Protein besitzt eine Signalsequenz und zwei weitere hydrophobe Abschnitte. Repetitive Sequenzanteile sind nicht vorhanden. Western Blot Analyse von Schizontproteinen mit Kaninchen-Antiseren, welche gegen ein Expressionsprodukt hergestellt wurden, das 70 % der codierenden Region beinhaltet, ergab eine Bande von 29 kD. Weiterhin konnte durch Northern Blot Analyse eine mRNA von 1.6 kb nachgewiesen werden.

Die Insert DNA des Klons 41-7 codiert dagegen für das 41kD Protein. Kaninchen-Antiseren, welche gegen ein Fusionsprotein von 41-7 hergestellt wurden, erkennen im Western Blot eindeutig eine 41kD Bande. Durch Screening einer genomischen lambda gt10 EcoRI<sup>r</sup> Genbank mit der Insert DNA des Klons 41-7 konnte ein Klon identifiziert werden, der ein malariaspezifisches Insert von 2.3kb enthält. Dieses wurde isoliert und sequenziert. Es enthält die gesamte codierende Region für ein 41kD Protein. Das Gen codiert keine Signalsequenz und enthält weder Introns noch repetitive Abschnitte. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des 41kD Proteins von *P.falciparum* ist hochhomolog (>60%) zu Aldolasen aus Muskel und Leber von Säugern und zur Aldolase von *Trypanosoma brucei*. Im Gegensatz zum Säugergenom konnte für *P.falciparum* nur ein Aldolasegen pro Genom durch Southern Blot Analysen festgestellt werden.

Die Klone 41-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 17 wurden aufgrund ihrer Kreuzreaktivitäten mit dem Antiserum gegen die 41kD Proteinbande detektiert. Sie sind zur Herstellung einer Vaccine geeignet. Die Insert-DNAs der Klone 41-1 bis 41-5, sowie 41-7, 41-10 und 41-14 wurden in dem Vektor pEX-31 zur Expression gebracht und die resultierenden Fusionsproteine wurden gereinigt. Eine Kombination einer immunologisch wirksamen Menge von drei Expressionsprodukten (41-1, 41-2, 41-3) schützt Aotusaffen vor einer *P.falciparum* Infektion.

Die Erfindung betrifft folglich

- a) die gereinigten und isolierten DNA-Sequenzen der Klone 41-1 bis 41-10, 41-12 bis 41-15 und 41-17 sowie 41-2gen und 41-7gen einschließlich ihrer Transkriptionsprodukte,
- b) diese Sequenzen ganz oder teilweise enthaltenden DNA-Strukturen und Vektoren,
- c) mit solcher DNA transformierte pro- oder eukaryotische Zellen,
- d) die von diesen Zellen auf Grund der Transformation exprimierten Polypeptide oder Teile davon,
- e) deren Aminosäuresequenzen,

- f) Antikörper gegen die Polypeptide unter (d) einschließlich ihrer Anwendung zur passiven Immunisierung, zur Diagnostik und zur Reinigung besagter Polypeptide,  
 g) Impfstoffe gegen Malaria, die Aminosäuresequenzen von (e) alleine oder in Kombination enthalten,  
 h) ein Verfahren zur gentechnischen Herstellung der unter (d) angeführten Polypeptide oder Teilen davon,  
 i) sowie Anwendung der besagten Aminosäuresequenzen zur Diagnostik.

Weitere Ausgestaltungen der Erfindung sind in den nachfolgenden Beispielen, Tabellen und den Patentansprüchen aufgeführt.

## Beispiele

### Beispiel 1:

Screening einer lambda gt10-Expressions-Bank mit dem monospezifischen anti-41kD Serum

10<sup>6</sup> PFU (plaque forming units) einer genomischen lambda gt10 Expressionsbank (hergestellt aus DNA des *P.falciparum*-Stammes T996) wurden mit einem Antiserum gegen die 41kD Antigenbande (L.H. Perrin et al. (1985) a.a.O.) aus dem *P.falciparum*-Stamm SGE2 nach bekannten Methoden (L.S. Ozaki (1986), J. Immun. Method. 89, 213-219; Promega Biotec (1986), Proto Blot Immunoscreening System, Technical Manual) gescreent. Als Detektionssystem diente dabei ein anti-Kaninchen-IgG / alkalische Phosphatase-Konjugat (Promega, Bestell- Nr. P 3731).

Durch das Screening der genomischen lambda gt10-Genbank mit dem Antiserum gegen die 41kD Proteinbande konnten zwei sehr intensiv reagierende Klone (41-2 und 41-7) sowie dreizehn weitere schwächer reagierende Klone (41-1, 41-3, 41-4, 41-5, 41-6, 41-8, 41-9, 41-10, 41-12, 41-13, 41-14, 41-15 und 41-17) und etwa 40 weitere sehr schwach reagierende Klone identifiziert werden. Die Insert-DNA's der fünfzehn Klone, die 140bp bis 650bp betragen, wurden mit EcoRI herausgeschnitten und zur weiteren Charakterisierung in die EcoRI-Stelle des Vektors pUC8 kloniert.

### Beispiel 2

Sequenzierung der Insert-Fragmente Klone 41-1 bis 41-10, 41-12 bis 41-15 und 41-17

Die Sequenzierung der Insert-DNAs erfolgte nach der Didesoxymethode mit Hilfe eines Primers und eines Reverse Primers direkt von den pUC8-Plasmiden (E.Y. Chen and P.H. Seeburg (1985), DNA 4, 165-170). Die Tabellen 1-15 zeigen die malaria-spezifischen DNA-Sequenzen und die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Klone 41-1, 41-2, 41-3, 41-4, 41-5, 41-6, 41-7, 41-8, 41-9, 41-10, 41-12, 41-13, 41-14, 41-15 und 41-17 in den einzig möglichen offenen Leserahmen. Innerhalb dieser 15 Sequenzabschnitte findet man keinerlei Überlappungen und Homologien. Mit Hilfe des UWGCG (University of Wisconsin, Genetic Computer Group)-Programms wurden diese 15 Sequenzen auf homologe Sequenzabschnitte innerhalb der EMBL-Datenbank untersucht. Keine dieser 15 Partialsequenzen oder größere homologe Abschnitte sind bisher beschrieben worden. Lediglich die Sequenz des Klon 41-10 besitzt von Nukleotid 1 bis 134 eine 74 %ige Homologie mit einer Teilsequenz von Nukleotid 2144 bis 2274 des 140kD Protein Gens, wie in der Anmeldung DE-P 37 41 057 vorgeschlagen. Die Sequenz des Klon 41-10 ist auch die einzige, welche für *P.falciparum*-Proteine typische repetitive Sequenzabschnitte beinhaltet. Die Aminosäuresequenz dieses Klon verfügt über drei Tetrapeptide der Sequenz Pro-Ser-Glu-Ser, wobei der zweite Serinrest des zweiten Repeats, verursacht durch eine G-A Transition, durch einen Asparagin-Rest ersetzt ist.

Weiterhin besitzt die Sequenz des Klon 41-7 von Nukleotid 50 bis 163 eine 56 %ige Homologie mit einer Aldolase mRNA von Nukleotid 218 bis 331 aus der Ratte (T. Mucai et al. (1986), J. Biol. Chem. 261, 3347-3354).

## Beispiel 3

Nachweis des 41kD Antigens mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen die Expressionsklone 41-2 und 41-7

Aus dem Antiserum gegen die 41kD Proteinbande wurden nach der Methode von L.S. Ozaki (1986, a.a.O.) Antikörper isoliert, die spezifisch gegen die Produkte der Expressionsklone 41-1, 41-2, 41-3, 41-7, 41-8 und lambda gtlI (Kontrolle) gerichtet sind.

Zur Gewinnung von Schizonten wurde *P.falciparum* in Humanerythrozyten kultiviert (W. Trager und J.B. Jensen (1976), Science 193, 673-675) und durch Behandlung mit Sorbit synchronisiert (C. Lambros und J.P. Vanderberg (1979), J.Parasitol. 65, 418-420). Eine Anreicherung der Schizonten auf ca. 90 % wurde durch Flotation in Gelafundin<sup>(R)</sup> (Braun Melsungen) erzielt (analog G. Pasvol et al. (1978), Ann.Trop.Med.Parasitol. 72, 87-88). Die Schizonten wurden abzentrifugiert, gewaschen, 5 min. in SDS-Probenpuffer auf 100 °C erhitzt, mit Ultraschall behandelt und aliquotiert eingefroren.

Aliquots der Schizontenlösung wurden für die Western blot Analyse der oben erwähnten spezifischen Antikörper verwendet (D.A. Johnson et al. (1984) Gene Anal. Tech. 1, 3-8). Dabei reagierten die Antikörper, die mit Hilfe der Expressionsklone 41-2 und 41-7 isoliert wurden, sehr intensiv mit einer 41kD Antigenbande aus Schizonten.

## Beispiel 4

Klonierung eines DNA-Fragmentes, das die genetische Information des Klons 41-2 beinhaltet

15 µg genomische DNA des *P.falciparum*-Stammes FCBP, die durch Lyse von Schizont-Kulturen mit anschließender Ethidiumbromid-CsCl-Zentrifugation gewonnen wurden (P. Oquendo et al. (1986) Molecular and Biochemical Parasitology 18, 89-101), wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut, nach der Vorschrift des Herstellers auf Gene Screen Membranen (Dupont) gebロットet und anschließend mit nicktranslatierter Insert-DNA des Klons 41-2 mit einer spezifischen Aktivität von 10<sup>7</sup> bis 10<sup>8</sup> dpm/µg hybridisiert. Nach dem Waschen des Filters in 0,3xSSC (1xSSC: 0,15 M NaCl, 0,015 M NA-Citrat) und 1 % SDS (Natriumdodecylsulfat) bei 65 °C für 1 h wurden die Filter autoradiographiert. Mit Hilfe dieses Southern Blot Experimentes wurde ein ca. 3kb großes genomisches EcoRI Fragment identifiziert, das mit der Insert-DNA des Klons 41-2 hybridisiert. In einem präparativen Gel wurden 60 µg mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnittene *P.falciparum* DNA des Stammes FCBP aufgetrennt, die Region von 2,8kb bis 3,2kb wurde ausgeschnitten und elektroeluiert (B. Perbal (1984), A Practical Guide to Molecular Cloning). Diese DNA wurde nach der Methode von T.V. Huynh et al. (in DNA cloning Vol. I, ed. D.M. Glover (1985), 49-88) in den Vector lambda gt10 kloniert. 10<sup>5</sup> PFU der erhaltenen Genbank wurden mit nicktranslatierter Insert-DNA des Klons 41-2 nach bekannten Methoden (T. Maniatis et al. (1982), Molecular Cloning, A Laboratory Manual) gescreent. Daraus resultierten mehrere Phagenklone, die mit der Insert-DNA des Klons 41-2 hybridisierten. Die Phagen DNA eines dieser Klone wurde isoliert (R.W. Davis et al. (1980), A Manual for Genetic Engineering, Advanced Bacterial Genetics), und mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut; ein 3,0kb großes DNA-Fragment wurde gelelektrophoretisch gereinigt und in die EcoRI-Restriktionsstelle des Vektors pUC18 subkloniert (Plasmid pUC 41-2gen). In der anschließenden Southern-Blot Analyse (T. Maniatis et al., a.a.O.) hybridisierte dieses 3,0kb EcoRI-DNA-Fragment des pUC 41-2gen, mit der Insert-DNA des Klons 41-2.

## Beispiel 5:

Sequenzanalyse des Klons pUC 41-2gen

Die Plasmid-DNA pUC 41-2gen wurde mit Hilfe eines Primers und Reverse-Primers von den EcoRI-Randstellen aus sequenziert (E.Y. Chen and P.H. Seeburg (1985) a. a. O.). Daraus konnten von den Enden des 3,0 kb EcoRI- Fragmentes jeweils etwa 250 Basen bestimmt werden. Die Sequenz eines dieser Enden ist dabei identisch mit der Insert-DNA des Klons 41-2. Zur Erstellung einer Restriktionskarte wurden je 0,5

5  $\mu$ g des isolierten 3,0 kb EcoRI-DNA-Fragmentes mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen inkubiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit nicktranslatierter Insert-DNA des Klons 41-2 nach bekannten Methoden (T. Maniatis, a.a.O.) hybridisiert. Anhand der Größe der zu hybridisierenden Restriktionsfragmente konnte auf die Entfernung verschiedener Restriktionsschnittstellen zur EcoRI-Schnittstelle, die den beiden Klonen 41-2 und pUC 41-2gen gemeinsam ist, geschlossen werden. Ausgehend von der so erstellten Restriktionskarte wurden Restriktionsfragmente des Klons pUC 41-2gen isoliert und zur Sequenzierung in die Phagenvektoren M13mp18 und M13mp19 subkloniert (F. Sanger et al. (1977), Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 74, 5463-5467). Die Sequenz wurde dabei von der dem Gen eigenen EcoRI-Restriktionsstelle in Richtung zum 5'-Ende des Gens bis zu einer DraI-Restriktionsschnittstelle bestimmt.

10 Die Tabelle 16 zeigt die DNA-Sequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz dieses 1230bp umfassenden DraI-EcoRI-DNA-Fragmentes des Klons pUC 41-2-gen. Die Sequenz von Position 1036 bis 1228 ist identisch mit der Insert-DNA von 41-2. Da die Sequenz des Klons 41-2 und die genomische Sequenz des Klons pUC 41-2gen von unterschiedlichen *P.falciparum*-Stämmen herrühren (Stamm T996 aus Thailand und Stamm FCBR aus Kolumbien), scheint zumindest dieser Genabschnitt sehr konserviert zu sein. Der offene Leserahmen dieser Sequenz beginnt in Position 784 mit einem ATG-Startcodon und endet mit einem TTC-Codon, welches zu der dem Gen internen EcoRI-Restriktionsschnittstelle gehört. Dieser Teil codiert für die 149 N-terminalen Aminosäuren des Proteins. Die Partialsequenz dieses Gens verfügt über keine repetitiven Sequenzanteile. Die abgeleitete Aminosäuresequenz beginnt mit einem Sequenzabschnitt von 18 Aminosäuren, von denen 4 sauer und 5 basisch sind. Gefolgt wird dieser Sequenzabschnitt von einem hydrophoben Teil bestehend aus 11 Resten, der von beiden Seiten durch saure Aminosäurereste flankiert ist. Diese hydrophobe Region könnte als Signalsequenz fungieren. Die Region mit basischen und sauren Aminosäuren vor dieser putativen Signalsequenz ist relativ lang; ähnlich lange Regionen wurden jedoch auch für andere *P.falciparum* Proteine beschrieben (T. Triglia et al. (1987), The EMBO Journal 6, 1413-1419). Die abgeleitete Aminosäuresequenz wurde mit Hilfe des UWGCG-Programms auf hydrophile Regionen und

25 Oberflächenbereiche sowie auf potentielle immunogene Epitop-Bereiche untersucht. Dabei wurden drei hydrophile Bereiche des Proteins ermittelt, die durch die Nukleotidsequenzen der Positionen 890 bis 907, 1079 bis 1093 und 1151 bis 1168 codiert werden.

Der 5' nicht codierende Bereich des Gens ist extrem AT-reich (AT-Gehalt = 88,8 %), wie dies auch für andere *P.falciparum* Gene beschrieben wurde (J.L. Weber (1987), Gene 52, 103-109) und verfügt in jedem der drei Leserahmen über jeweils mehr als 15 Stopcodons. Weiterhin ist in Position 274 eine mögliche CAAT-Box vorhanden, von der 64 Nukleotide "down stream" eine mögliche TATA-Box lokalisiert ist. Diese Strukturen könnten eine mögliche Promotorregion für dieses Gen spezifizieren.

35 Beispiel 6:

#### Isolierung des vollständigen Gens für 41-2

40 Die Sequenzanalyse des Klons pUC 41-2gen ergab eine Sau3A Schnittstelle, die 947 bp von der EcoRI-Schnittstelle entfernt ist. Durch genomische Southern Blot Analyse wurde ein 2,0 kb großes Sau3A Fragment identifiziert, das mit der Insert-DNA des Klons 41-2 hybridisiert (vgl. Beispiel 4). Somit sollte dieses Sau3A Fragment in 3' Richtung von der EcoRI-Stelle etwa über 1050 bp der genetischen Information des 41-2 Gens verfügen. In einem präparativen Gel wurden 60  $\mu$ g mit dem Restriktionsenzym Sau3A geschnittene DNA des Stammes FCBR aufgetrennt und DNA-Fragmente von 1.8 kb bis 2.2 kb isoliert.

45 Diese DNA wurde wie vom Hersteller (Stratagene) angegeben in die XhoI-Stelle des Vektors lambda ZAP kloniert. 10<sup>5</sup> PFU dieser Genbank wurden mit nicktranslatierter Insert-DNA des Klons 41-2 gescreent und etwa 40 Phagenklone wurden identifiziert (vgl. Beispiel 4). Von einem dieser Phagenklone wurde durch automatische Excision nach der Methode von Stratagene eine Blueskript-Vektor (pSK<sup>-</sup> 41-2gen) isoliert.

50 Durch Restriktion dieser Plasmid-DNA mit KpnI und EcoRI konnten zwei DNA-Fragmente von 950 bp und 1050 bp isoliert werden, von denen das 950 bp Fragment im Southern Blot mit der Insert-DNA des Klons 41-2 hybridisierte. Die Plasmid-DNA pSK<sup>-</sup> 41-2 wurde mit Hilfe eines Primers und Reverse Primers sequenziert (E.Y. Chen und P.H. Seeburg (1985) a.a.O.). Die Sequenz, die mit Hilfe des Primers sequenziert wurde, ist identisch mit der Sequenz der Insert-DNA des Plasmids pUC 41-2gen von der Sau3A stelle in 3'

55 Richtung. Das 1050 bp EcoRI DNA Fragment des Plasmids pSK<sup>-</sup> 41-2gen wurde in die EcoRI-Stelle des Vektors pKS<sup>+</sup> subkloniert (T. Maniatis et al., a.a.O.). Von diesem DNA-Fragment wurde eine Restriktionskarte erstellt. Ausgehend von dieser wurden Restriktionsfragmente in die Bluescript-Vektoren subkloniert und nach der ssDNA Präparation sequenziert. (Instruction manual von Stratagene). Die Sequenz wurde dabei

von der EcoRI-Restriktionsstelle des 41-2 Gens in 3' Richtung bis zur Sau3A-Stelle vollständig bestimmt. Die Tabelle 17 zeigt in Fortsetzung zur Tabelle 16 die DNA-Sequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz dieses 1050 bp umfassenden EcoRI-Sau3A-DNA-Fragmentes des Klons pSK<sup>-</sup> 41-2gen. Dieser Genabschnitt codiert lediglich noch für 35 zusätzliche Aminosäuren, bis ein TAG Stopcodon folgt. Der 3' nicht codierende Bereich des Gens ist extrem AT-reich (AT-Gehalt = 84,7 %) und enthält in jedem der drei Leserahmen jeweils mehr als 11 Stopcodons. Die S1-Mapping-Technik (F.M. Ausubel et al. (1987), Current Protocols in Molecular Biology, Harvard Medical School, Boston) ergab keinerlei Hinweise für einen Intron-Exon-Aufbau dieses Gens. Schließlich wurde durch Northern Blot Analyse (T. Maniatis et al., a.a.O) eine mRNA des Schizontenstadiums in der Größe von 1.6 kb detektiert. Daher muß angenommen werden, daß das 41-2 Gen nur einen einzigen codierenden Abschnitt von 552 bp besitzt (AT-Gehalt = 73 %). Dieser codiert für ein Antigen von 21512 Dalton, welches eine Signalsequenz (vgl. Beispiel 5), aber keine repetitiven Abschnitte besitzt. Dieses Antigen verfügt neben der Signalsequenz über zwei weitere hydrophobe Abschnitte in den Aminosäurepositionen 73 bis 85 und 130 bis 147, die eventuell eine Funktion für die Membranverankerung besitzen.

#### Beispiel 7:

Expression der Inserts der Klone 41-1 bis 41-5 sowie 41-7, 41-10 und 41-14 in dem Vektor pEX31

Die Insertfragmente der Klone 41-1 bis 41-5, 41-7, 41-10 und 41-14 wurden nach Restriktion mit EcoRI geelektrophoretisch isoliert, in den dephosphorylierten, mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdauten Vektor pEX31b ligiert (K. Strebel et al. (1986) Journal of Virology 57, 983-991) und in kompetente, das Plasmid pCI857 (F. Remaut et al. (1981), Gene 15, 81-93) enthaltende C600-Bakterien transformiert. Einzelne Kolonien wurden mittels SDS-PAGE auf Expression der Plasmodien-spezifischen DNA-Sequenzen als MS2-Polymerase-Fusionsproteine hin untersucht. Die Induktion erfolgte durch Temperaturerhöhung nach der Methode von H. Küpper et al. (in Y. Ikeda and T. Bepu (ed). Proceedings of the Fourth International Symposium on Genetics of Industrial Mikroorganisms (1982), Kyoto Kodansha Ltd., Tokyo). Alle 8 Fragmente konnten in hoher Ausbeute zur Expression gebracht werden.

#### Beispiel 8:

Reinigung der Expressionsprodukte

Kulturen von transformierten Bakterien wurden jeweils in 1 l LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin bei 28 °C 20 h heftig geschüttelt. Nach Zugabe von 4 l auf 42 °C erwärmtem LB-Medium wurde erneut 4 h bei 42 °C geschüttelt. Die Bakterien wurden abzentrifugiert, in 200 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) resuspendiert und mechanisch aufgeschlossen. Die löslichen Proteine wurden durch Zentrifugation abgetrennt und die Sedimente, die die Expressionsprodukte enthielten, nach zweimaligem Waschen mit PBS nacheinander mit steigenden Harnstoffkonzentrationen (von 1 M bis etwa 5 M) gewaschen, bis die Fusionsproteine in Lösung gingen. Anschließend wurde mit fallenden Harnstoffkonzentrationen bis zu der Harnstoffkonzentration dialysiert, die ausreichte, um die Expressionsprodukte in Lösung zu halten. Dieses Verfahren führte zu einem Reinheitsgrad von 60-80 %.

#### Beispiel 9:

Nachweis des Antigens, das durch 41-2gen codiert wird

Mittels Kaninchen-Antiseren, die gegen das Expressionsprodukt des Klons 41-2 gerichtet sind, ließ sich im Western Blot mit Schizontproteinen kein Malariaantigen eindeutig nachweisen. Deshalb sollte ein größeres DNA-Fragment des Gens 41-2 exprimiert werden. Dazu wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme AluI und EcoRI ein 383 bp Fragment des 41-2 Gens isoliert, daß 70 % der codierenden Region beinhaltet. Dies wurde in die SmaI- und EcoRI-Stellen des Plasmids pUC18 subkloniert. Aus diesem Plasmid wurde mit

Hilfe des Restriktionsenzym *EcoRI* ein 401 bp Fragment isoliert und in die *EcoRI*-Stelle des Vektors pEX31b kloniert. Nach der Transformation konnten Bakterienkolonien identifiziert werden, welche ein Fusionsprotein von 26 kD exprimieren (vgl. Beispiel 7). Dieses wurde gereinigt (vgl. Beispiel 8) und zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Die Antiseren erkennen im Western Blot mit Schizontenproteinen ein 29 kD Antigen, das durch das 41-2 Gen codiert wird. Die Differenz von dem kalkulierten Molekulargewicht von 22 kD zu dem Molekulargewicht von 29 kD in SDS-Polyacrylamidgelen kann durch Sekundärmodifikation erklärt werden. So besitzt das Protein in dem Asparagin-Rest in Position 166 eine N-Glykosylierungsstelle.

Daß von dem Klon 41-2 ein recht kleines Antigen codiert wird, wird auch durch Northern Blot Analyse bestätigt. So wurde im Schizontenstadium von *P.falciparum* eine mRNA von 1,6 kb detektiert, welche mit der Insert-DNA des Klons 41-2 hybridisiert. Die Northern Blot Analyse wurde nach bekannten Methoden (T. Maniatis et al., a.a.O.) durchgeführt.

#### Beispiel 10:

##### Antigenzuordnung weiterer Klone

Antiseren gegen die gereinigten Fusionsproteine der Klone 41-1, 41-3, 41-4, 41-5, 41-7 und 41-10 wurden dazu benutzt, die korrespondierenden Antigene durch Western Blot Analyse mit Schizontproteinen zu identifizieren. Dabei ließen die Antiseren gegen die Fusionsproteine der Klone 41-1, 41-3 und 41-4 keine eindeutigen Identifizierungen zu. Die Insert-DNA des Klons 41-5 kann einem 96 kD Antigen zugeordnet werden. Eine Dreiergruppe von 96 kD Antigenen von *P.falciparum* wurde beschrieben (H. Jouin et al. (1987), Inf. Imm. 55, 1387-1392). Antiseren, die gegen ein Expressionsprodukt des Klons 41-10 gerichtet sind, erkennen zwei Antigene von 113 und 140 kD. Die Reaktion mit dem 113 kD-Antigen wurde als Kreuzreaktion mit dem SERPI Antigen (vgl. Beispiel 2) identifiziert, das mit einem protektiven Antigen identisch ist. 41-10 codiert somit eine 140 kD Protein von *P.falciparum*.

Gemeinsam ist all diesen Genen, daß die von ihnen codierten Antigene oder Teile davon mit einem Serum reagieren, das gegen eine protektiv wirkende 41 kD Proteinbande gerichtet ist. Nur der Klon 41-7, der neben dem Klon 41-2 die stärkste Reaktivität mit dem Antiserum gegen die 41 kD Proteinbande besitzt, kann eindeutig einem 41 kD Protein zugeordnet werden.

Antiseren, die gegen das Fusionsprotein des Klons 41-7 gerichtet sind, erkennen im Western Blot mit Schizontproteinen eindeutig die 41 kD Proteinbande, die auch von dem Ausgangsserum erkannt wird. Dieser Klon scheint somit ein Teilfragment des 41 kD Antigens zu codieren. Daß die untersuchten Klone Teilsequenzen verschiedener Gene tragen, wurde für die Klone 41-1, 41-2, 41-3, 41-7, 41-10, 41-14 und 41-15 auch durch Southern Blot Analysen bestätigt.

#### Beispiel 11

##### Herstellung einer genomischen lambda gtl Genbank

2 µg DNA des *P.falciparum* Stammes FCBR wurden über Nacht bei 37 °C mit 14 Einheiten des Restriktionsenzym *EcoRI* in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Dithiothreitol und 40 % Glycerin inkubiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Unter diesen Bedingungen zeigt das Restriktionsenzym *EcoRI* Stern-Aktivität, wodurch sich DNA-Fragmente von etwa 50 bp bis 10 kb bilden. Die DNA-Region zwischen 500 bp und 7 kb wurde elektroeluiert und nach der Methode von T.V. Huynh et al. (1985; in DNA cloning Vol. I, a practical approach, ed. D.M. Glover) in den Vektor lambda gtl kloniert. Es wurde eine Genbank von 5 x 10<sup>5</sup> rekombinanten Phagenklonen hergestellt, welche amplifiziert wurde.

#### Beispiel 12:

##### Isolierung und Sequenzierung des 41-7 Gens

Da der Klon 41-7 tatsächlich für ein Teilfragment eines 41 kD Proteins codiert (vgl. Beispiel 10), sollte das vollständige Gen isoliert werden. Dazu wurde die genomische lambda gtlI EcoRI<sup>+</sup> Genbank (vgl. Beispiel 11) nach bekannten Methoden (T. Maniatis et al., a.a.O.) mit nicktranslatierter Insert DNA des Klons 41-7 gescreent. Daraus resultierten drei lambda gtlI Klone, von denen mit Hilfe der Restriktionsenzyme EcoRI und Sall jeweils ein 3.3 kb großes Insert isoliert werden konnte. Der malarispezifische Anteil des Inserts beträgt 2.3 kb. Von diesem DNA-Fragment wurde eine Restriktionskarte erstellt. Ausgehend von dieser wurden Subfragmente zur Sequenzierung in die Bluescript Vektoren (Stratagene) kloniert. Die vollständige DNA-Sequenz dieses 2.3 kb großen malarispezifischen Fragmentes konnte aufgeklärt werden. Tabelle 18 zeigt die DNA-Sequenz des 41-7 Gens mit der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz. Das Gen besitzt keine Introns. Von der 5' nicht codierenden Region wurden 525 Basenpaare (AT-Gehalt = 84,2 %) und von der 3' nicht codierenden Region 772 Basenpaare (AT-Gehalt = 84,2 %) ermittelt. Der mittlere Abschnitt besteht aus 1086 Basenpaaren (AT-Gehalt = 64,4 %) und codiert für 362 Aminosäuren. Das berechnete Molekulargewicht dieses Gens von 39314 D stimmt gut mit dem gelelektrophoretisch ermittelten Molekulargewicht von 41 kD überein. Dieses Gen wird in eine 2,4 kb große mRNA transkribiert, was durch Northern Blot Analyse nach bekannten Methoden ermittelt wurde (T. Maniatis et al. a.a.O.). Durch Southern Blot Analyse (vgl. Beispiel 4) konnte abgeleitet werden, daß nur eine Kopie dieses Gens pro *P.falciparum* Genom existiert. Außerdem wurde gefunden, daß dieses Gen bei verschiedenen *P.falciparum* Stämmen (FCBR aus Kolumbien, Palo Alto aus Uganda, SGE2 aus Zaire, ItG<sub>2</sub>G<sub>1</sub> aus Brasilien und FVOR aus Vietnam) konserviert ist. Zudem ist die malarispezifische DNA-Sequenz des Klons 41-7 (Stamm T996 aus Thailand) identisch zu der Teilsequenz des aus dem FCBR-Stamm isolierten Gens von Position 464 bis 729. Der Klon 41-7 codiert somit für die 88 N-terminalen Aminosäuren des 41 kD Proteins.

Aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz ist ersichtlich, daß das 41 kD Protein keine Signalsequenz und keine repetitiven Abschnitte enthält. Mit Hilfe des UWGCG (University of Wisconsin, Genetic Computer Group) Programms wurde diese Aminosäuresequenz auf homologe Proteine innerhalb der NBRF-Protein-Datenbank untersucht. Dabei wurde gefunden, daß das 41 kD Protein zu 66 % homolog zur Leber-Aldolase des Menschen (M. Mukai et al., (1985), Nucleic Acid Res. 13, 5055-5069), zu 66 % zur Leber-Aldolase aus der Ratte (K. Tsutsami et al. (1984) J. Biol. Chem. 259, 14572- 14575), zu 68 % homolog zur Muskel-Aldolase aus dem Kaninchen (D.R. Tolan et al. (1984), J. Biol. Chem. 259, 1127-1131) und zu 61 % homolog zur Aldolase aus *Trypanosoma brucei* (C.E. Clayton (1985) EMBO J. 4, 2997-3003) ist. Das 41 kD Protein scheint somit die *P.falciparum* Aldolase zu sein.

#### Beispiel 13:

Schutzversuch im Tiermodell: Immunisierung von *Aotus lemurinus griseimembra* (Karyotyp VI)

Dieses Experiment wurde durchgeführt, um die Wirksamkeit der beschriebenen Expressionsprodukte bezüglich der Induktion von schützender Immunität in für *P. falciparum* empfänglichen Affen zu prüfen. Als Versuchsimpfstoff diente eine Kombination der Expressionsprodukte der immunologisch stark reagierenden Klone 41-1, 41-2 und 41-3.

#### 1. Versuchsanordnung

6 Aotusaffen der o.g. Spezies (1000-1500 g Körpergewicht, männliche und weibliche Tiere aus der Zucht der Behringwerke AG) wurden randomisiert und in 2 Gruppen zu je 3 Tieren aufgeteilt.

Fusionsproteine der Klone 41-1, 41-2 und 41-3 wurden in PBS 3 M Harnstoff gelöst und im Verhältnis 1:1:1 gemischt. (Endkonzentration: 300 µg Protein/ml). 3 Tiere wurden in Abständen von 3 Wochen 3 x mit jeweils 1 ml der kombinierten Fusionsproteine subkutan immunisiert. Als Adjuvans diente eine 10%ige Zumischung von 50% Al(OH)<sub>3</sub>/ 45% Lecithin/5% Saponin zum Antigen.

3 Tiere der Infektions-Kontrollgruppe erhielten ebenfalls nach o.g. Schema jeweils eine Injection aus PBS 3 M Harnstoff + Adjuvans ohne Antigenkomponente.

Um eine möglichst gleichstarke experimentelle *P.falciparum*-Infektion in den Tieren zu gewährleisten, wurden alle Affen acht Tage nach der letzten Immunisierung splenektomiert (erhöhte Suszeptibilität).

Am 67. Tag nach der 1. Vaccinierung wurden alle 6 Tiere mit  $5 \times 10^6$  parasitierten Erythrozyten intravenös infiziert. Als Challenge-Stamm wurde *P. falciparum*-Palo Alto (Uganda) gewählt, der, in vitro auf Aotus-Erythrozyten adaptiert, von einem splenektomierten Spendertier (4 % Parasitärmie) direkt auf die



Versuchstiere übertragen wurde. Dieser Stamm zeichnet sich durch eine hohe Infektiosität im Vergleich zu anderen *P. falciparum*-Isolaten aus. Es ist außerdem interessant zu erwähnen, daß dieser Stamm heterolog zu dem für die Gewinnung der Immunisierungsantigene verwendeten Stamm T996 (Thailand) bezüglich Provenienz und Serotyp ist.

5 Während der gesamten Verlaufsstudie (vor und nach Immunisierung sowie nach Challenge) wurden physiologische, parasitologische, serologische und klinischchemische Parameter regelmäßig untersucht.

## 2. Ergebnisse

10

Während der gesamten Immunisierungsphase zeigten sich keine pathologischen Veränderungen aller untersuchten physiologischen (klinisches Erscheinungsbild, Temperatur, Gewicht) und klinisch-chemischen Parameter (Erythrozyten, Hämatokrit, Blutsenkung, Serumenzyme GPT und GOT). Zusätzliche sicherheitspharmakologische Untersuchungen (akute subkutane Toxizität in der Maus, lokale Verträglichkeit am Affen nach Richtlinien der Europäischen Pharmakopoe) bescheinigten der verwendeten Impfstoff-Präparation ausreichende Sicherheit und Verträglichkeit.

15

### 2.1 Parasitämie

20

Hauptparameter für die Wertbemessung eines induzierten Schutzes (Protektion) ist der mikroskopische Nachweis parasitierter Erythrozyten im peripheren Blut des Versuchstieres.

25

Bereits vom 7.-10. Tag nach der Infektion konnten vereinzelt parasitierte Erythrozyten (kleiner als 1 Promille) im Giemsa-gefärbten Blutsausstrich der nicht immunisierten Tiere nachgewiesen werden. Die immunisierten Tiere zeigten ein verzögertes Auftreten von Parasiten vom 10.-15. Tag p.i., erreichten maximale Parasitämien von 1-2 % und kontrollierten die Infektion spontan. Ein Tier starb interkurrent an Pneumonie.

30

Während ein Tier der nicht Immunisierten Gruppe eine maximale Parasitämie von 4,5 % selbst kontrollieren konnte, mußten die beiden anderen Tiere nach Erreichen einer Parasitämie von > 10 % mit Mefloquin<sup>(R)</sup> (Hoffmann La Roche) behandelt werden, um einen tödlichen Infektionsverlauf zu verhindern. Der Challenge-Stamm Palo Alto erwies sich in vorausgegangenen Infektionsversuchen als Chloroquin-resistent.

35

Figur 1 zeigt links den Verlauf der Parasitämie in Aotus-Affen nach Immunisierung mit einer Kombinationsvaccine bestehend aus Fusionsproteinen der Klone 41-1, 41-2 und 41-3, rechts den der Kontrolle (nicht immunisierte Tiere).

40

45

50

55

**TABELLE 1:**

Nukleotidsequenz des malaria-spezifischen DNA-Inserts  
des Klons 41-1 und abgeleitete Aminosäuresequenz

```

5      10      30      50
TAAATCTTTATGTATTTTAAACAAAGAAATAAAAAGGTAAGGTCATCAAATAATTCAT
  LvsSerLeuCysIlePheLysGlnArgAsnLysLysValArgSerSerAsnAsnSerS

10     70     90     110
CTTTCTTAATTGATTTTAGAACTCACATACGAATAATATCAATATGTTAACAGAAAATC
erPheLeuIleAspPheArgAsnSerHisThrAsnAsnIleAsnMetLeuThrGluAsnG

15    130    150    170
AAAAGTTTAATAATGTATTATTEAATAAAGAAATTCAGATGGATGAAAATCAGGAACGTG
InLysPheAsnAsnValLeuLeuAsnLysGluIleGlnMetAspGluAsnGlnGluArgG

20    190    210    230
AATTTTCAATTGATGATTGTTTAATGAACTGCCTGAAACATAATGCATCTAATTTAAAAA
luPheSerIleAspAspCysLeuMetAsnCysLeuLysHisAsnAlaSerAsnLeuLvsT

25    250    270    290
CCAATGAAGATTATGAAAGATATTGTAATGAAGACAAAATATTGAATCCAGATTATAAGC
hrAsnGluAspTvrGluArgTvrCysAsnGluAspLysIleLeuAsnProAspTvrLvsP

30    310    330    350
CTTCAGAACTAGAAAACCTGGGAGAAAAATTTTTGCAAAAAGTCAAAAGGAATTATATT
roSerGluSerArgLysLeuGlvGluLysPheLeuGlnLvsSerGlnLvsGluLeuTvrT

35    370
ATTCTTATGC
yrSerTyr

```

**TABELLE 2:**

Nukleotidsequenz des malaria-spezifischen DNA-Inserts des  
Klons 41-2 und abgeleitete Aminosäuresequenz

```

40     10     30     50
AACATGTGTGGAAATATTTATTTTCAGCATTCATCTGATTTACTTAAATCTCAAGATAGTA
  HisValTrpLysTyrLeuPheGlnHisSerSerAspLeuLeuLysSerGlnAspSerI

45     70     90     110
TTTATGAGTATATGATATGTGATAAAAAATTTTATTAAATAAATTTATAAATGTACCAA
leTyrGluTyrMetIleCysAspLysAsnIleLeuLeuAsnLysPheIleAsnValProL

50    130    150    170
AAGATTATGGAAATATAAATTGTGCTGCCTTTGCAGCAGGTATTGTTGAAGGCTTCCTCT
ysAspTyrGlyAsnIleAsnCysAlaAlaPheAlaAlaGlyIleValGluGlyPheLeuC

55    190
GTAGTTCTGAATTC
ysSerSerGluPhe

```

TABELLE 3:

Nukleotidsequenz des malaria-spezifischen DNA-Inserts des  
Klons 41-3 und abgeleitete Aminosäuresequenz

5                   10                   30                   50  
CAGTAAAAATTTTAAAAAAGAAAAATTTAAGAAAAATAAGGAAACCACTGATGAAG  
ValLysIleLeuLysLysLysLysAsnLeuArgLysIleLysGluThrThrAspGluG  
  
                  70                   90                   110  
10 AGAAACTTCAGATAATGTTTCTCAAATGTATGAAAGAAAGGTGGACCATTACCACCAC  
luLysThrSerAspAsnValSerGlnMetTyrGluArgLysGlyGlyProLeuProProp  
  
                  130  
CCGAAGCTAGAAAACA  
15 roGluLeuArgLys

TABELLE 4:

Nukleotidsequenz des malaria-spezifischen DNA-Inserts des  
Klons 41-4 und abgeleitete Aminosäuresequenz

25                   10                   30                   50  
GTATACCTGAATTTTATAGGACAATATCATAATGTTCCCATGTATTCAAAGATTATATGA  
IleProGluPheLeuGlyGlnTyrHisAsnValProHisValPheLysAspTyrMetS  
  
                  70                   90                   110  
30 GTTCCAATGATTTTATAAGTGGTATAAATAATATAAATGAATCAGATGCTCTTTTAAATA  
erSerAsnAspPheIleSerGlyIleAsnAsnIleAsnGluSerAspAlaLeuPheAsnA  
  
                  130                   150  
ACATACAATATATAAACCAGCGAATGACCAAGAAGAAAACAAATT  
35 snIleGlnTyrIleAsnGlnAlaAsnAspGlnGluGluAsnLys

TABELLE 5:

Nukleotidsequenz des malaria-spezifischen DNA-Inserts des  
Klons 41-5 und abgeleitete Aminosäuresequenzen

45                   10                   30                   50  
TGTTTGATAATAGTGATTTTATTAAATCAATAATGGATTCTAATAAACAATTAAAAAAGT  
PheAspAsnSerAspPheIleLysSerIleMetAspSerAsnLysGlnLeuLysLysL  
  
                  70                   90                   110  
50 TAAGAGAACAAAATTCTGATTTAAATCATATTTTAAATGATTCTCAGACTTTAAACAAT  
euArgGluGlnAsnSerAspLeuAsnHisIleLeuAsnAspSerGlnThrLeuLysGlnS  
  
                  130                   150                   170  
CTTTTGAAATGATTAAGAATCCATCTTTGATGAAAGAATTAATGAAAAATACTGATAGAG  
erPheGluMetIleLysAsnProSerLeuMetLysGluLeuMetLysAsnThrAspArgA  
  
                  190  
55 CTATTAGTAATATTGAAGCCATACC  
laIleSerAsnIleGluAlaIle

**TABELLE 6:**

Nukleotidsequenz des malaria-spezifischen DNA-Inserts des  
Klons 41-6 und abgeleitete Aminosäuresequenz

10 30 50  
TCGTTGTCCTTTTCCTTTGGTGATAAACGCAATGAGATAAAACAAAAAATTGACACGTTTT  
ValValLeuSerPheGlyAspLysArgAsnGluIleLysGlnLysIleAspThrPheC  
70 90 110  
GTGGTGTAAGTAATGAAGAAAAGGAGAACTAAAGGAACAATGGAAATGCTATGAAGCTA  
ysGlyValSerAsnGluGluLysGluLysLeuLysGluGlnTrpLysCysTyrGluAlaL  
130 150  
AATATGTAAAGGAAGATAATAAAAGTAAAG  
ysTyrValLysGluAspAsnLysSerLys

**TABELLE 7:**

Nukleotidsequenz des malaria-spezifischen DNA-Inserts des  
Klons 41-7 und abgeleitete Aminosäuresequenz

10 30 50  
TGAATGCCCCAAAAAATTACCAGCAGATGTTGCCGAAGAATTAGCAACCACCGCCCCAAA  
AsnAlaProLysLysLeuProAlaAspValAlaGluGluLeuAlaThrThrAlaGlnL  
70 90 110  
AGCTTGTTCAAGCTGGAAAGGGAATTTTAGCTGCTGATGAATCAACACAAACCATTAAAGA  
ysLeuValGlnAlaGlyLysGlyIleLeuAlaAlaAspGluSerThrGlnThrIleLysL  
130 150 170  
AAAGATTTCGACAACATCAAATTAGAGAACACAATAGAAAACAGAGCTAGCTACAGAGATT  
ysArgPheAspAsnIleLysLeuGluAsnThrIleGluAsnArgAlaSerTyrArgAspL  
190 210 230  
TATTATTTGGAAGTAAAGGATTAGGAAAATTCATTTTCAGGAGCAATTTTATTGAAGAAA  
euLeuPheGlyThrLysGlyLeuGlyLysPheIleSerGlyAlaIleLeuPheGluGluT  
250  
CATTATTTCAAAGAATGAAGCCGGT  
hrLeuPheGlnLysAsnGluAlaGly

TABELLE 8:

Nukleotidsequenz des malaria-spezifischen DNA-Inserts des  
Klons 41-8 und abgeleitete Aminosäuresequenz

5

10                      30                      50  
TAACATTTTCTGTAGATACAAAACAAAATTTAAATGCATCTTATTCTAGTGGACAAGAAA  
ThrPheSerValAspThrLysGlnAsnLeuAsnAlaSerTyrSerSerGlyGlnGluA  
10  
70                      90                      110  
ATAAACAAAATGAATCTGATGAAAAGAAAATGAAGAAGATGAAGAAAATAAGGTATATG  
snLysGlnAsnGluSerAspGlyLysGluAsnGluGluAspGluGluAsnLysValTyrA  
15  
130                      150                      170  
ATTTAATACTGGAAAATATAGAACCTAACAAAAAATACCCATCATAAAAATCGTTAAAG  
spLeuIleLeuGluAsnIleGluProAsnLysLysIleProIleIleLysIleValLysG  
20  
190                      210                      230  
AAATAAAAAAAGATCTTAATTTAAAAACAAGCAAAGGATTTAGTTGATAATTTGCCACA  
luIleLysLysAspLeuAsnLeuLysGlnAlaLysAspLeuValAspAsnLeuPro

25

TABELLE 9:

Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des  
malaria-spezifischen Inserts-DNA des Klons 41-9

30

10                      30                      50  
AAAATAAAATTATACAGGTAATTCTCCAAGTGAAAATAATAAGAAAGTTAACGAAGCTT  
AsnLysAsnTyrThrGlyAsnSerProSerGluAsnAsnLysLysValAsnGluAlaL  
35  
70                      90                      110  
TAAATCTTACGAAAATTTTCTCCAGAAGCAAAAGTTACAACAGTTGTAACCTCCACCTC  
euLysSerTyrGluAsnPheLeuProGluAlaLysValThrThrValValThrProProG  
40  
130                      150                      170  
AACCAGATGTAACCTCCATCTCCATTATCTGTAAGGGTAAGTGGTAGTTCAGGATCCACAA  
lnProAspValThrProSerProLeuSerValArgValSerGlySerSerGlySerThrL  
45  
190                      210                      230  
AAGAAGAAACACAAATACCAACTTCAGGCTCTTTATTAACAGAATTACAACAAGTAGTAC  
ysGluGluThrGlnIleProThrSerGlySerLeuLeuThrGluLeuGlnGlnValValG  
250                      270                      290  
AATCACAAAATTATGACGAAGAAGATGATTCCTTAGTTGTATTACCCATTTTTGGAGAAT  
lnSerGlnAsnTyrAspGluGluAspAspSerLeuValValLeuProIlePheGlyGluS  
50  
310                      330                      350  
CCGAAGATAATGACGAATATTTAGATCAAGTAGTAAGTGGAGAAGCAATATCTGTCACAA  
erGluAspAsnAspGluTyrLeuAspGlnValValThrGlyGluAlaIleSerValThrM  
55  
370                      390  
TGGATAATATCTCTCAGGATTTGAAAATGAATATGA  
etAspAsnIleLeuSerGlyPheGluAsnGluTyr

TABELLE 10:

Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des  
malaria-spezifischen Inserts-DNA des Kions 41-10

```

      10              30              50
AATCTCATTCTGACGAAAATATTGTAACCTTACAAGGAAACTTAGAAATACAGCTATCT
  SerHisSerAspGluAsnIleValThrLeuGlnGlyLysLeuArgAsnThrAlaIleC
10
      70              90              110
GTATAAAGAATGTTGATGAATGGATATTAAATAAAAGAGGTCTAACATTACCTAGTGAAT
ysIleLysAsnValAspGluTrpIleLeuAsnLysArgGlyLeuThrLeuProSerGluS
15
      130              150
CACCTAATGAATCACCTAGTGAATCAGATAGTTATCTTAA
erProAsnGluSerProSerGluSerAspSerTyrLeu

```

TABELLE 11:

Nukleotidsequenz des malaria-spezifischen DNA-Inserts des  
Kions 41-12 und abgeleitete Aminosäuresequenz

```

      10              30              50
ATGAAGGAGAAGAATTAATATTAAATGATGATCAAAATAAATTACATATTGATACATTG
  GluGlyGluGluLeuIleLeuAsnAspAspGlnAsnLysLeuHisIleAspThrPheG
30
      70              90              110
AAAAATACAAATATCTCATTGTGAAAATATTAATAATGACAAATTTGTTATAAAAAATA
luLysTyrLysTyrLeuIleCysGluAsnIleAsnAsnAspLysPheValIleLysAsnA
35
      130              150              170
ATCAAATTACAACATTTGAAAACTTTTTGAAAAACCAACAAATTTTGAAATAA
snGlnIleThrThrPheGluAsnPheLeuLysAsnGlnGlnAsnPheGluIle
40
45
50
55

```

TABELLE 12:

Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des  
malaria-spezifischen Inserts des Klons 41-13

5

	20	40	60
	TAAATAATGAAAATATGGATAAACAAATGTTAATATTCAAAATGAAGGTAATGGTTTTA		
10	AsnAsnGluAsnMetAspLysGlnAsnValAsnIleGlnAsnGluGlyAsnGlyPheA		
	80	100	120
	ATAATAATAAAAATAATAATGATCTTTTAAATGTTTATATATCACCTAATATGATTAATC		
	snAsnAsnLysAsnAsnAsnAspLeuLeuAsnValTyrIleSerProAsnMetIleAsnH		
15	140	160	180
	ATTCTTTATCTTCAACTTGTGAAAAAAAAAATAAAGAAGATAACAAATGAATGACAATA		
	isSerLeuSerSerThrCysGluLysLysAsnLysGluAspAsnLysMetAsnAspAsnL		
	200	220	240
20	AATTTCTTAATAGCAGTAGTAAAATGAAAATTCAGAGATAAGTACGAACAACTCAAATG		
	ysPheLeuAsnSerSerSerLysMetLysIleProGluIleSerThrAsnAsnSerAsnG		
	260	280	300
25	AAAAGATTGTTAATGTGTCAAATGATGAAATGTTAGTATATCATAATTTAACCGTATTAA		
	luLysIleValAsnValSerAsnAspGluMetLeuValTyrHisAsnLeuThrValLeuA		
	320	340	360
	ATGTAAAGGAACAAGGAGGTGTAACAGAAGAATCGAGCTGTATAAAACGCACATATTTTG		
	snValLysGluGlnGlyGlyValThrGluGluSerSerCysIleLysArgThrTyrPheV		
30	380	400	420
	TGGATCAATTTTATGATTCATATAATATGAGAAATGAAAAATAACAGATGATAATATGC		
	alAspGlnPheTyrAspSerTyrAsnMetArgAsnGluLysIleThrAspAspAsnMetG		
	440	460	480
35	AAGTAGAAGATATATATAATGTAAAGGAAAATATAAAAGAACTCTAAAAGGTGATGGTC		
	lnValGluAspIleTyrAsnValLysGluAsnIleLysArgThrLeuLysGlyAspGlyP		
	500	520	540
40	CTGATGATGTCAAACGAATATGCTGAGTGAAGATAATAGTTATGCAAGTGGTTTATGGG		
	roAspAspValLysThrAsnMetLeuSerGluAspAsnSerTyrAlaSerGlyLeuTrpG		
	560	580	600
45	GTAACGAAATAAACTTTATTAGTAATAATGAAAATTGTTTAAATAGCTATGATATATCAT		
	lyAsnGluIleAsnPheIleSerAsnAsnGluAsnCysLeuAsnSerTyrAspIleSerC		
50	620	640	
	GTGATGAGAAATATATCCCAAATGAAGAGGAACAGGA		
	ysAspGluLysTyrIleProAsnGluGluGluGln		

55

TABELLE 13:

Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des  
malaria-spezifischen Inserts des Klons 41-14

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

10	30	50
ACAACAATATGAACAGAATAAATAGTTTAAACAATAAAAAATAATATTAACCCTATAAATC		
AsnAsnMetAsnArgIleAsnSerLeuAsnAsnLysAsnAsnIleAsnProIleAsnG		
70	90	110
AATACAATGATGAAAAACAAAACCTTACTTAACGNCCATCTTCAGTYCAATCAAGTAAATT		
InTyrAsnAspGluLysGlnAsnLeuLeuAsnXxxHisLeuGlnXxxAsnGlnValAsnT		
130	150	170
ATNATAATAACCTTGTGAATGGCYTTCATANAANNAATTTTAAAGCAATAATAATTATA		
yrXxxAsnAsnLeuValAsnGlyXxxHisXxxXxxLysPheLeuSerAsnAsnAsnTyrI		
190	210	230
TTAATACTACAGATATTAATGGAAATAATATGATTAGTCATAATGATCATATGAATAATA		
leAsnThrThrAspIleAsnGlyAsnAsnMetIleSerHisAsnAspHisMetAsnAsnL		
250	270	290
AATTATACAGTAATATAAACAATAATTATTATTATAATAGGGCTAACAATGAAATTCCTA		
ysLeuTyrSerAsnIleAsnAsnAsnTyrTyrTyrAsnArgAlaAsnAsnGluIleProA		
310	330	350
ATAATAATAGTAACAATCATAATAATAATTTCAATATATATGAATCCAAATACCAAACCA		
snAsnAsnSerAsnAsnHisAsnAsnAsnPheAsnIleTyrGluSerLysTyrGlnThrM		
370	390	410
TGATTCATAACAACAACATAGGACAAGATCTAAAACAACAAATAAATAATTATAATGAAA		
etIleHisAsnAsnAsnIleGlyGlnAspLeuLysGlnGlnIleAsnAsnTyrAsnGluA		
430	450	470
ATACATCTTCTAATAATAATTTAAGTATATCTCAATTACTTGAGGGAAATACAAATTTTA		
snThrSerSerAsnAsnAsnLeuSerIleSerGlnLeuLeuGluGlyAsnThrAsnPheI		
490	510	530
TAAATATTTCTAATACATTTATTAATACGAATTATTCTAATGATTTTCATCA		
leAsnIleSerAsnThrPheIleAsnThrAsnTyrSerAsnAspPheHis		



TABELLE 14:

Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des  
malaria-spezifischen Inserts des Klons 41-15.

5

```

      10      30      50
ACAGCAACAATAATAATAATAATAATATTAGTAATAATATTAGTAATAATAAAG
  SerAsnAsnAsnAsnAsnAsnAsnAsnIleSerAsnAsnIleSerAsnAsnLysA
10      70      90      110
ATTGTGATGAATACGATTATCAGGAAGAATATTTGAAAGATAAAGCATTATACGATTACG
spCysAspGluTyrAspTyrGlnGluGluTyrLeuLysAspLysAlaLeuTyrAspSera
15      130      150      170
ATATGGACGAAAATACAAATCAACTTCACAATAATGAACATCATACAAATCAACATCAG
spMetAspGluAsnThrAsnGlnLeuHisAsnAsnGluHisHisThrAsnGlnHisHisA
20      190      210      230
CAAATTGGCATCATCACAACATCAAAGCAACATTTCAAACAACTTATTGATCATAACA
laAsnTrpHisHisHisLysHisGlnLysGlnHisPheLysGlnLeuIleAspHisAsnA
25      250      270
ATATGATAATAATAATGATAATAATATTATCAATAA
snMetIleAsnAsnAsnAspAsnAsnIleIleAsn

```

25

TABELLE 15:

Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des  
malaria-spezifischen Inserts des Klons 41-17

30

```

      20      40      60
GCACTGCCACCCCTTGTTGCGGAAGAATTGCACCAGCTCGGCTATTCACTGGCGCTGGGTC
35  ThrAlaThrLeuValAlaGluGluLeuHisGlnLeuGlyTyrSerLeuAlaLeuGlyA
      80      100
GCGAAGTAGTTAATGAAAGTAGCCGGATGGGATTACCTGATGAATTC
40  rgGluValValAsnGluSerSerArgMetGlyLeuProAspGluPhe

```

40

45

50

55

TABELLE 16:

Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des 5' Endes des *P. falciparum* (Isolat FCBR) Genes, das durch das Insert des Klonen 41-2 spezifiziert wird.

10	10	30	50
	TTTTAAAAATTTTATAAATAATTTTTCTCTTTTATATTTAATACATCTATAAGTATATATG		
	70	90	110
	TAATAATTTGATACACAAGAAATGTTATTTTAAATATATATATATATATATATATATAT		
15	130	150	170
	AT		
	190	210	230
	TTCCATAATTTATTAAAAATAAATTTATATATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTTG		
20	250	270	290
	TATATATTAAATCTTTTCAATGGAATAAAATTCATCGGATCGTTATATAAACTTTATTA		
	310	330	350
	TATCAATAAAACACTTTTATAAATAACGAAAAATATATTTCTTATTTTATGTTTT		
25	370	390	410
	CAAAATTTTAGTAGACTTATAATATTATTATGGATAACATTAACAAATAAAATATTATG		
	430	450	470
	AGTATAATATGTAATTATTTTTTTTTTTTTTACAGTTTATATGTTTATGAACATATAATG		
30	490	510	530
	TGATAAATAAAATTGATTAATTATTATTATATATAATTACTCTTGTAAATTTATTAAATG		
	550	570	590
	GTATATTATATATATATATATAATTTTTTTTTTATATTATTTGAATAAAATATTAAATAAA		
35	610	630	650
	AATTTTGTGTTTGGGTAAATCATAATAAGTGCTAACGTTTCATAATTTATCTCATTAAAAA		
	670	690	710
	ATAGAAATGAAATATAATTTTACGACAGTACATATATATATATATGTATATTATTAAAAAA		
40	730	750	770
	AAATAAAATAACACATATATATATATATATATATATATATATTGATAATATATATGTTTTA		
	790	810	830
45	AGTATGGATAAATCAAAAAGTTCCATAGAGAAAGAATTAAATAGGATAAAACAGGATGTG		
	MetAspLysSerLysSerSerIleGluLysGluLeuAsnArgIleLysGlnAspVal		
	850	870	890
	AGCTTAAGCGCATTTAGTATCTCTTTAGTGAAATGGTACAATATTGTTTATATAAAAGT		
	SerLeuSerAlaPheSerIleLeuPheSerGluMetValGlnTyrCysLeuTyrLysSer		
50	910	930	950
	AAAAGAGGATATCGAATAGAAGATTGTTTACATGAAATGGGTTTACGTGTAGGTTATAAA		
	LysArgGlyTyrArgIleGluAspCysLeuHisGluMetGlyLeuArgValGlyTyrLys		
	970	990	1010
55	TTAAATGAATATTTAATATATAAGAATAAAGTGAAAAGAAGCATAAATATTATTAATATT		
	LeuAsnGluTyrLeuThrTyrLysAsnLysValLysArgSerIleAsnIleIleAsnIle		

TABELLE 16:

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

1030	1050	1070
TTAACATT CATATCTAAACATGTGTGGAAATATTTATTTTCAGCATT CATCTGATTTACTT		
LeuThrPheIleSerLysHisValTrpLysTyrLeuPheGlnHisSerSerAspLeuLeu		
1090	1110	1130
AAATCTCAAGATAGTATTTATGAGTATATGATATGTGATAAAAATATTTTATTAAATAAA		
LysSerGlnAspSerIleTyrGluTyrMetIleCysAspLysAsnIleLeuLeuAsnLys		
1150	1170	1190
TTTATAAATGTACCAAAGATTATGGAAATATAAATTGTGCTGCCTTTGCAGCAGGTATT		
PheIleAsnValProLysAspTyrGlyAsnIleAsnCysAlaAlaPheAlaAlaGlyIle		
1210	1230	
GTTGAAGGCTTCCTCTGTAGTTCTGAATTC		
ValGluGlyPheLeuCysSerSerGluPhe		

**TABELLE 17:**

Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des 3'Endes des *P.falciparum* (Isolat FCBR) Genes, das durch das Insert des Klonen 41-2 spezifiziert wird.

1240 1260 1280  
GAATTC CAAGCAGATGTTACAGCGCACACTATT CATGAAGGCGATGATAATTATAACACT  
GluPheGlnAlaAspValThrAlaHisThrIleHisGluGlyAspAspAsnTyrAsnThr

1300 1320 1340  
ACTATTTTTATTAAATTTTATCCGGAAGTAGTGGAAGAGAAAAAACCACTAGATATTC  
ThrIlePheIleLysPheTyrProGluValValGluArgGluLysAsnHis

1360 1380 1400  
ATATAAGGGTCACACAATAAATATATATATATAATACATGTTGTATAAGTTGTCAAAAAA

1420 1440 1460  
TTTATATGGAATAATAAATTAATATGTAAATATATATATATATATATATATATATAT

1480 1500 1520  
TCTTCTCTTCTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTTATTATTAATGTATTATTTATCCTTATG

1540 1560 1580  
CATGGGATTATTTAACAAATTTATTGATAAAATAAATGTACCCTTTTTTTTTTTTTCTTT

1600 1620 1540  
TTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTGTAATAACATATTTATATATATTTATATTTAATTAACCT

1660 1680 1700  
TTTTTAACATTTTAAATCTATATGAAATAATAAATGAAGACATGACTATTTTAATACAG

1720 1740 1760  
GAAATTAATGGTTCCTTAAATTTACATAAAAAAAAAAATAAACATATAATATATATAT

1780 1800 1820  
ATATATATATAAAACACTTGGTTCAAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAA

1840 1860 1880  
TTTGTATGGAGATATTATAATATTTAAACAATATATATGACATATATAGAGGACATACTG

1900 1920 1940  
TTACCAATATTTTCAATACATTGTTGGAATTTTTTATTTTTTTCATATATCATACATAAGA

1960 1980 2000  
CCTTCTGGAAAAGAAAAAGTAATAAAGTGTCTTATATACTATTAATTTTGAATATAGAT

2020 2040 2060  
TTTTTTTCTTTTCTTCAAATTA AAAAGTATTCTATCAATGTATGTA AAATATATAATT

2080 2100 2120  
TTACTTTTTTTTTTGTTCTTTTTTCTATTTTTTAAATACGTATGTCCTCGTTTTTTTTTTT

2140 2160 2180  
CTTTTTATAACATTATTTGCATATTCCAAATTTTTTCTATGTGTCCA AAAAAAAAAAAAAA

2200 2220 2240  
AAAAAAATAAAGTGTTAATAAAAAAATTAAATAATATATGTGAAGATACTTTTTTTAATA

2260  
TGCATATGTATATATATTTATATATATAGATC

TABELLE 18:

Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des  
41 kD Proteins von P.falciparum.

5	10	30	50
	AATTTTTTTTTTGAATATTCTTTT	AGCATTGATATAATATTATTTT	GAAAATGGTAAG
10	70	90	110
	AATATAAACATTTAAGAAATAAATAAA	AGTACAGTGTTTATATATACCGTATAAATGAA	
15	130	150	170
	TAAGTGATATATATATATATATATTA	AATACATTTATATTATTAATTTATACCAATGCA	
20	190	210	230
	TAGTTATATATATATATACTATTATATAT	GTATTCATTTTATTCTGCTCACATTATTTAT	
25	250	270	290
	GCAATATGCTTCCTTTATAATAAATATATTC	GTATTAACATTCAAGAAATGAGGACGAAAT	
30	310	330	350
	ATTCCTTAATTTACATATGTATTTTTTTT	ATTAAATTGAAAAAAAAAAAAAAAAATAGTAAAAA	
35	370	390	410
	TAAGTATAGGCATATATTGAATAATGTGCTG	TGTTGAATTGATTTATATATATATATATA	
40	430	450	470
	TATATGTATATTTATTTATATTTATACATAT	GCGGAATATTATATATTTTCCTTTTTTCTT	
45	490	510	530
	ATTTTTATATTTTATATTTTTTTTTT	AGGCTCATTGCACTGATATATGAATGCCCCAAAA	MetAsnAlaProLys
50	550	570	590
	AAATTACCAGCAGATGTTGCCGAAGAATTAGCA	ACCACCGCCCCAAAAGCTTGTTCAAGCT	
55	610	630	650
	GGAAAGGGAATTTTAGCTGCTGATGAATCA	CACAAACCATTAAAGAAAAGATTTCGACAAC	
60	670	690	710
	ATCAAATTAGAGAACACAATAGAAAAACAGAG	CTAGCTACAGAGATTATTTATTTGGAAC	
65	730	750	770
	AAAGGATTAGGAAAATTCATTTCAAGAGCA	ATTTTATTTGAAGAAACATTATTTCAAAG	
70	790	810	830
	AATGAAGCCGGTGACCAATGGTTAATTTAT	TACACAATGAAAATATAATTCCAGGTATT	
75	850	870	890
	AAGGTTGATAAAGGTTTGGTTAACATTCCAT	GCACAGATGAAGAAAAATCAACTCAAGGT	
80	910	930	950
	TTAGATGGATTAGCAGAAAGATGCAAAGAG	TATTATAAAGCTGGTGCAAGGTTTGCTAAA	

TABELLE 18:

5	LeuAspGlyLeuAlaGluArgCysLysGluTyrTyrLysAlaGlyAlaArgPheAlaLys		
	970	990	1010
	TGGAGAACAGTTTTAGTTATTGACACAGCCAAAGGAAAACCAACTGATTTATCAATTCAC		
10	TrpArgThrValLeuValIleAspThrAlaLysGlyLysProThrAspLeuSerIleHis		
	1030	1050	1070
	GAAACTGCATGGGGATTGGCTAGATATGCATCTATTTGTCAACAAAATAGATTAGTTCCA		
	GluThrAlaTrpGlyLeuAlaArgTyrAlaSerIleCysGlnGlnAsnArgLeuValPro		
15	1090	1110	1130
	ATTGTTGAACCTGAAATTTTAGCTGATGGACCACACTCAATTGAAGTTTGTGCAGTTGTA		
	IleValGluProGluIleLeuAlaAspGlyProHisSerIleGluValCysAlaValVal		
	1150	1170	1190
20	ACTCAAAAAGTTTTATCATGTGTATTTAAAGCTTTACAAGAAAATGGTGTATTATTAGAA		
	ThrGlnLysValLeuSerCysValPheLysAlaLeuGlnGluAsnGlyValLeuLeuGlu		
	1210	1230	1250
	GGTGCATTGTTAAACCAAACATGGTTACTGCTGGTTATGAATGTACTGCTAAAACCACT		
	GlyAlaLeuLeuLysProAsnMetValThrAlaGlyTyrGluCysThrAlaLysThrThr		
25	1270	1290	1310
	ACTCAAGATGTTGGTTTCTTAACTGTCAGAACCTTAAGGAGAACTGTACCACCAGCCTTA		
	ThrGlnAspValGlyPheLeuThrValArgThrLeuArgArgThrValProProAlaLeu		
	1330	1350	1370
30	CCAGGTGTTGTATTTTTATCTGGAGGACAATCAGAAGAAGAGGCTTCTGTTAATTTAAAT		
	ProGlyValValPheLeuSerGlyGlyGlnSerGluGluGluAlaSerValAsnLeuAsn		
	1390	1410	1430
35	TCAATCAATGCTTTGGGTCCACACCCATGGGCTTTAACCTTCTCTTACGGTAGAGCTTTA		
	SerIleAsnAlaLeuGlyProHisProTrpAlaLeuThrPheSerTyrGlyArgAlaLeu		
	1450	1470	1490
	CAAGCTTCAGTATTGAACACATGGCAAGGAAAGAAAGAAAATGTTGCAAAGGCAAGAGAA		
	GlnAlaSerValLeuAsnThrTrpGlnGlyLysLysGluAsnValAlaLysAlaArgGlu		
40	1510	1530	1550
	GTTTTATTACAAAGAGCTGAAGCCAACCTTAGCAACTTATGGTAAATACAAAGGAGGT		
	ValLeuLeuGlnArgAlaGluAlaAsnSerLeuAlaThrTyrGlyLysTyrLysGlyGly		
	1570	1590	1610
45	GCAGGTGGTGAAAATGCAGGTGCTTCATTATATGAAAAGAAATATGTCTATTAAAACTT		
	AlaGlyGlyGluAsnAlaGlyAlaSerLeuTyrGluLysLysTyrValTyr		
	1630	1650	1670
	CACCAACCAAAAATGAATAATAATAATAATAATAAATTACTAAATGAATGGTACTATAT		
50	1690	1710	1730
	TTTTAAAAATAAGGGTAATATATTTCTGTATGTATATATATATATATATATATACAAATA		
	1750	1770	1790
	TGTGAATATAAAAAAAAAAAAAAAAAAATGTAATATATATCGATCAATGTATATCTACGATAT		
55	1810	1830	1850

TABELLE 18:

5

ATAAATATATATTTATTCATATCTCCCTTTTTTAGATGATATATTATAATACCTAAAATT

10

1870 1890 1910  
ATATATATTTATTTATTATTATTTTATTTATTTAATAATTTTTTTTTTATTAGTAAATGAT

1930 1950 1970  
AATAAATTTTTTAAACGTTTTTCAACGTTTATTAAATGTGTAAATATAAATATAAATA

15

1990 2010 2030  
TTATATATATATATATATATATATATATGTATGTATTTATTTATTTATTTATATATACATACAT

2050 2070 2090  
ACCTGTTGACATTCATGTAATATAATAAAGGAACACATGCTTATTTTGTATTATATATCT

20

2110 2130 2150  
TACCTTCTACTTTTTTAATAAAAAATGTCAAAGCAGGAAATAAAAACTTTTTAATTTAACC

2170 2190 2210  
AAAAAAATATAATTAATGATGTACACTTATAGATATTGATACAAGAAAAACATTATATAT

25

2230 2250 2270  
GTTTTTTTTTCTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATTATAACAAAAATATTTATTA

2290 2310 2330  
TAATATATAATTTTAAATGAATGATGCAAATTTAATGAGCCATTTTATTTATATTTTAA

30

2350 2370  
TAATTATAATAATAACGTACATATATAAAATGGTGATTGAATT

35

**Ansprüche**

- 40 1. Proteine von Plasmodium falciparum mit Aminosäuresequenzen nach Tabelle 1 bis Tabelle 18 und antigenwirksame Teilsequenzen davon.
2. Proteine nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch Expression der Sequenzen der Klone 41-1, 41-2, 41-3, 41-4, 41-5, 41-6, 41-7, 41-8, 41-9, 41-10, 41-12, 41-13, 41-14, 41-15, 41-17, 41-2gen und 41-7gen.
3. Fusionsproteine, die Proteine nach Anspruch 1 enthalten.
- 45 4. DNA und RNA, codierend für Proteine nach Anspruch 1.
5. Gereinigte und isolierte DNA Sequenzen nach Tabelle 1 bis Tabelle 18, codierend für Proteine nach Anspruch 1, sowie dazu komplementäre hybridisierende Sequenzen.
6. Vektoren und DNA-Strukturen, die für Proteine nach Anspruch 1 oder 2 oder Fusionsproteine nach Anspruch 3 codieren.
- 50 7. Vektoren oder DNA-Strukturen, die DNA-Sequenzen nach Anspruch 5 enthalten.
8. Wirtszellen, enthaltend DNA nach Anspruch 4 oder 5 oder einen Vektor nach Anspruch 6 oder 7.
9. Proteine, exprimiert von einer Wirtszelle nach Anspruch 8.
10. Verfahren zur Herstellung von Proteinen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die für die Proteine nach Tabelle 1 bis Tabelle 18 kodierenden DNA-Sequenzen in pro- oder eukaryotischen Wirtssystemen exprimiert werden.
- 55 11. Polyklonale oder monoklonale Antikörper gegen Proteine nach Anspruch 1, 2 oder 3.
12. Vaccine, enthaltend eines oder mehrere der Antigene nach Anspruch 1, 2 oder 3.

13. Vaccine, enthaltend Proteine oder Teile davon, die durch Expression der Klone 41-1, 41-2, und 41-3 erhalten werden.

14. Mittel zur Immunprophylaxe, enthaltend Antikörper nach Anspruch 11.

15. Diagnostika, enthaltend DNA oder RNA nach Anspruch 4, 5, 6 oder 7.

5 16. Diagnostika, enthaltend Antikörper nach Anspruch 11.

17. Diagnostika, enthaltend Proteine nach Anspruch 1, 2 oder 3.

18. Proteine, isoliert mit Hilfe von Antikörpern nach Anspruch 11.

10 Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten:GR ES

1. Verfahren zur Herstellung von Plasmodium falciparum Proteinën, dadurch gekennzeichnet, daß die für die Aminosäuresequenzen oder antigen wirkenden Teile davon nach Tabelle 1 bis Tabelle 18 kodierenden DNA-Sequenzen in pro- oder eukaryotischen Wirtssystemen exprimiert werden.

15 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenzen der Klone 41-1, 41-2, 41-3, 41-4, 41-5, 41-6, 41-7, 41-8, 41-9, 41-10, 41-12, 41-13, 41-14, 41-15, 41-17, 41-2 gen und 41-7 gen eingesetzt werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß durch Anligieren an Sequenzen der Klone nach Anspruch 2 von anderen Proteinen oder Teilen davon Fusionsproteine hergestellt werden.

20 4. Verfahren zur Herstellung von poly- oder monoklonalen Antikörpern, dadurch gekennzeichnet, daß die nach Anspruch 1 oder 2 hergestellten Plasmodium falciparum Proteine zur Immunisierung eingesetzt werden.

5. Verfahren zur Herstellung einer Vaccine, dadurch gekennzeichnet, daß eines oder mehrere der nach Anspruch 1 oder 2 hergestellten Antigene eingesetzt werden.

25 6. Verfahren zur Isolierung von Plasmodium falciparum Proteinen, dadurch gekennzeichnet, daß die nach Anspruch 4 hergestellten Antikörper eingesetzt werden.

7. Verfahren zur Herstellung von Diagnostika, dadurch gekennzeichnet, daß nach Anspruch 4 hergestellte Antikörper eingesetzt werden.

30 8. Verfahren zur Herstellung von Diagnostika, dadurch gekennzeichnet, daß nach Anspruch 1 oder 2 erzeugte Plasmodium falciparum Proteine eingesetzt werden.

9. Verfahren zur Herstellung von Diagnostika, dadurch gekennzeichnet, daß die für Aminosäuresequenzen von Tabelle 1 bis Tabelle 18 kodierenden Nukleinsäuren eingesetzt werden.

35

40

45

50

55



FIG. 1 A

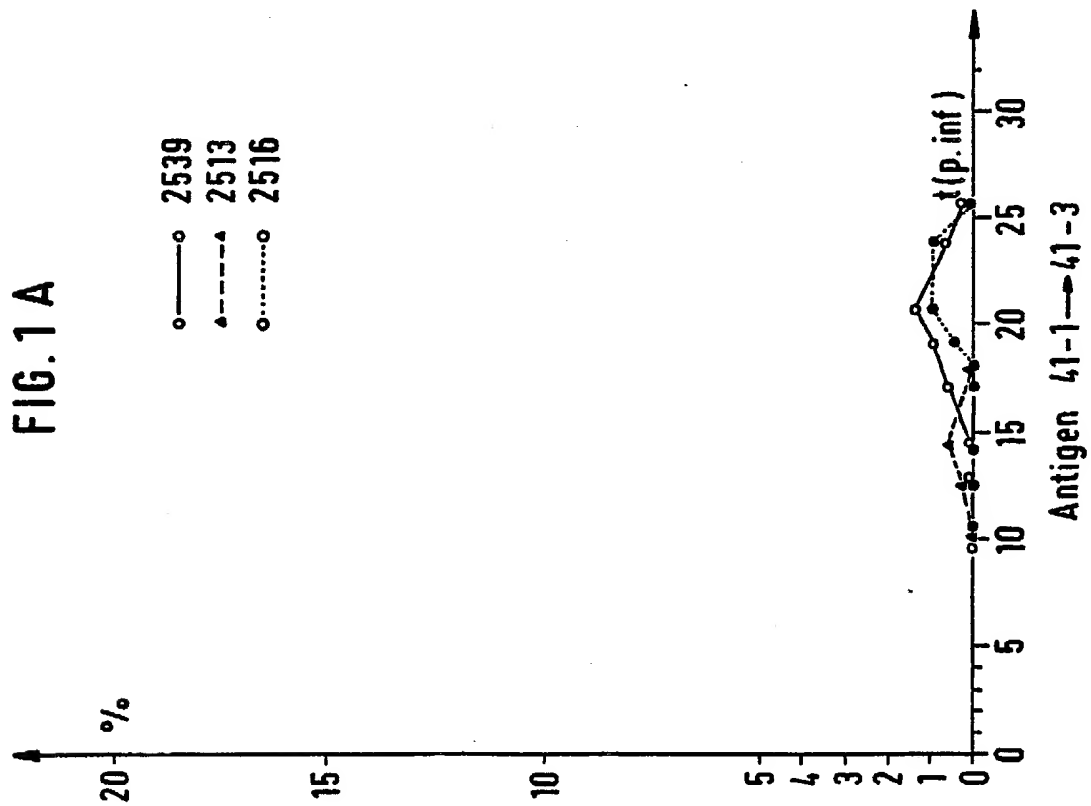


FIG. 1 B

